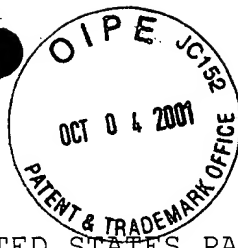


TAN-291



*2*  
*Monty Bayer*  
PATENT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re the application of:

Keiichi TAKAGAKI

Serial No.: 09/916,250

Group: 1646

Filed: July 30, 2001

Examiner:

For: METHOD FOR EXTRACTION AND PURIFICATION OF CARTILAGE TYPE  
PROTEOGLYCAN

Date: October 4, 2001

The Hon. Commissioner of  
Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231

**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 USC §119**

Sir:

Applicants are enclosing herewith the following  
certified priority document for use in claiming priority of the  
same under 35 U.S.C. §119:

Japanese Application No. 2000-251071, filed August 22,  
2000.

Applicants hereby claim priority of the above.

Respectfully submitted,

*[Signature]*  
Attorney for Applicants  
Robert L. Haines  
Reg. No. 35,533

SHERMAN & SHALLOWAY  
P.O. BOX 788  
Alexandria, Virginia 22313  
(703) 549-2282

RECEIVED  
OCT 09 2001  
TECH CENTER 1600/2900

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2000年 8月22日

出 願 番 号

Application Number:

特願2000-251071

出 願 人

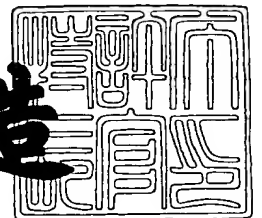
Applicant(s):

株式会社角弘  
高垣 啓一

2001年 9月10日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3083386

【書類名】 特許願

【整理番号】 P120111

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 C07K 1/00

【発明者】

    【住所又は居所】 青森県弘前市宮園1丁目1-13

    【氏名】 高垣 啓一

【特許出願人】

    【識別番号】 599142349

    【氏名又は名称】 株式会社角弘

【特許出願人】

    【住所又は居所】 青森県弘前市宮園1丁目1-13

    【氏名又は名称】 高垣 啓一

【代理人】

    【識別番号】 100089406

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 田中 宏

【選任した代理人】

    【識別番号】 100096563

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 樋口 榮四郎

【選任した代理人】

    【識別番号】 100110168

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 宮本 晴規

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 024040

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 軟骨型プロテオグリカンの精製方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 粗プロテオグリカンの溶出溶媒に酢酸を用いることを特徴とするプロテオグリカンの精製方法。

【請求項 2】 粗プロテオグリカンの溶出溶媒に酢酸を用い、得られた溶出液を濾過後遠心分離し、上澄み液に食塩飽和エタノールを加えて再度遠心分離して粗プロテオグリカンを濃縮させたことを特徴とするプロテオグリカンの精製方法。

【請求項 3】 粗プロテオグリカンの溶出溶媒に酢酸を用い、得られた溶出液を濾過後遠心分離し、上澄み液に食塩飽和エタノールを加えて遠心分離することにより得られた粗プロテオグリカンを含む半固形沈殿物を酢酸に溶解し、次いで透析することにより、粗プロテオグリカンの純度をさらに向上させることを特徴としたプロテオグリカンの精製方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は軟骨型プロテオグリカンの新規な精製方法に関するものである。

【0002】

【従来技術】

複合糖質としての軟骨型プロテオグリカン分子 1 個は、図 1 に示すような構造を有し、分子量数万から数十万のコアタンパク質と呼ばれる骨格のタンパク質 1 本に、分子量数千から数十万の長大な糖鎖グリコサミノグリカン（以下 G A G 糖鎖という。）が数本から数十本結合した生体高分子である。G A G 糖鎖は、その基本骨格によりコンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸など数種類に分けられ、基本的にはアミノ糖とウロン酸の二糖繰り返し構造からなる長鎖のヘテロ酸性多糖であり、ヒアルロン酸以外の G A G はコアタンパク質に結合してプロテオグリカンを形成している。

【0003】

プロテオグリカンは、コラーゲンやヒアルロン酸とともに、ほとんどすべての

動物組織において、細胞と細胞の間にある細胞外マトリックスの重要な構成成分として普遍的に存在しており（図2）、組織構築の重要な役割を担っているほか、細胞を取りまく物理的環境をつくり、接着、増殖、分化といったさまざまな細胞活動を制御している。細胞外マトリックスの各分子やGAGは、単独でも水分の保持と補充、解毒、鎮痛などの機能をもつが、これらがお互いに結合し、巨大な構造になって相互作用したときには、より大きな効果を発揮する。

## 【0004】

本発明の対象としている軟骨型プロテオグリカン、コラーゲン、ヒアルロン酸、GAGそれぞれのみの構造に比して巨大な分子量を持ち、かつ複雑な構造であるため、プロテオグリカン単独でも他より高い水分保持能力及び水分補充能力を持つとともに、そのGAG糖鎖部分の生物学的情報シグナル構造に依存した他の機能をも期待できる。

## 【0005】

しかし、現時点でのプロテオグリカンの精製方法は、主としてウシやクジラの軟骨を原材料として、クロロホルム、メタノール、グアニジン塩酸塩などのような毒性や有害性を有する試薬類を使用し、複雑な工程を経て精製しているが、産業上利用できるレベルではなく、実験用試薬として極微量に精製されたものが、1gあたり数千万円という価格で販売されている。

## 【0006】

本出願人は、以前サケの鼻軟骨を原材料とし、精製方法を簡略化し、産業上利用できるレベルの量産精製方法を発明し特許出願した（平成11年11月22日出願 特願平11-331375号）。この方法は具体的にはサケの鼻軟骨を粉砕、脱脂処理、溶媒抽出、透析等の手段を行うものであって、これにより大量精製、低コストの精製方法は得られたが、脱脂処理、あるいは溶媒抽出にクロロホルム、メタノール、グアニジン塩酸塩などの他にタンパク質分解酵素阻害剤等の有害試薬も用いたため、人体内に摂取する医薬品の医薬材料、健康補助食品の添加剤としての応用は難しく、医薬部外品、化粧品材料としての用途に限られていた。また、上記の試薬類の販売価格もかなり高額なため、精製コストの低減も限界があった。

## 【 0 0 0 7 】

他方、本出願人らは低価格のプロテオグリカンを発表したため、化粧品業界のみならず、加工食品、健康補助食品、医薬品業界からもプロテオグリカン応用商品の開発ニーズが高まった。しかし、プロテオグリカンを加工食品、健康補助食品、医薬品などへ応用するためには、プロテオグリカンの精製方法に特段の注意が必要である。プロテオグリカンの精製においてグアニジン塩酸塩を使用するというのが一般的であるが、そのグアニジン塩酸塩は無論のこと、クロロホルム、メタノール、タンパク質分解酵素阻害剤等の有毒、有害な試薬を一切使用しないこと、及びより簡便でより低コストな精製方法を得ることを強く求められた。

## 【 0 0 0 8 】

## 【発明が解決しようとする課題】

そこで、本発明者らは上述のような状況に対応してプロテオグリカンの精製過程において有毒、有害な試薬を一切使用しないこと、及びより簡単でより低コストな精製方法について種々検討した結果、本発明を完成したもので、本発明の目的は、有害な試薬を使用することなく簡単で低コストの軟骨型プロテオグリカンの精製方法を提供することである。

## 【 0 0 0 9 】

## 【課題を解決するための手段】

本願の請求項 1 の発明は、粗プロテオグリカンの溶出溶媒に酢酸を用いることを特徴とするプロテオグリカンの精製方法であり、請求項 2 の発明は、粗プロテオグリカンの溶出溶媒に酢酸を用い、得られた溶出液を濾過後遠心分離し、上澄み液に食塩飽和エタノールを加えて再度遠心分離して粗プロテオグリカン濃縮させたことを特徴とするプロテオグリカンの精製方法である。そして、請求項 3 の発明は、粗プロテオグリカンの溶出溶媒に酢酸を用い、得られた溶出液を濾過後遠心分離し、上澄み液に食塩飽和エタノールを加えて遠心分離することにより得られた粗プロテオグリカンを含む半固形沈殿物を酢酸に溶解し、次いで透析することにより、粗プロテオグリカンの純度をさらに向上させることを特徴としたプロテオグリカンの精製方法である。

## 【 0 0 1 0 】

即ち、本発明では、クロロホルム、メタノール、グアニジン塩酸塩、タンパク質分解酵素阻害剤等の有毒、有害な試薬に替えて、プロテオグリカンの全精製過程を通して酢酸、食塩及び未変性エタノールだけを使用することとした。これらの試薬はいずれも一般の加工食品に利用されているものばかりである。またより簡便な精製方法を得るために、前記の特許出願において用いていた尿素による置換、DEAE-Sephacel法による分離精製課程を省略することとした。

## 【0011】

## 【発明の実施の形態】

次に本発明の実施の形態を具体的に説明する。

本発明のプロテオグリカンの原材料としては、ウシやクジラの軟骨を使用してよいが、入手の容易性、及びコストの面等から見てサケの鼻軟骨が好ましく、特に、青森県沿岸で漁獲されたシロサケを缶詰等の食料品に加工処理した際に排出される頭部を使用することが好ましい。

使用する酢酸としては食品用、工業用品等何れでもよいが、その得られるプロテオグリカンの使用目的によって適宜選択する。その濃度は後述の試験より4%のものが好ましいが、この濃度に限定されるものではない。

## 【0012】

## 【実施例】

## 実施例 1

原料として青森県沿岸で漁獲されたシロサケを缶詰等の食料品に加工処理した際に排出される頭部を使用し、これを一旦-30℃にて保存する。

上記の保存した上記原料を4℃で20時間解凍後、包丁を用いてサケ頭部から鼻軟骨を採取して出発材料とした。このサケ鼻軟骨からピンセットを用いて固形脂肪を可及的に除去し、生理的食塩水で洗浄した。次いで、手回し式肉挽き器で細かく粉碎し、サケ鼻軟骨のミンチを得た。

このミンチの一部を10倍容量(W/V)の業務用醸造酢(食酢中の酢酸とほぼ同濃度の4%に希釈して使用する。以後4%酢酸と記す。)中に4℃で0, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168時間浸し、攪拌して、粗プロテオグリカンの溶出状態をカルバゾール・硫酸法によるウロン酸量として経時的に観察



した。その結果を図3に示す。図3より粗プロテオグリカンの溶出は24時間までに著しく増加し、その後の増加量は顕著でなかった。この結果により、4%酢酸に対する粗プロテオグリカンの溶出時間は、48時間が最も効率よいことが判明した。

上記の結果に基づいて、サケ鼻軟骨のミンチ50gを4%酢酸に、4℃で48時間浸し、攪拌して粗プロテオグリカンの溶出を行い、プロテオグリカンを得た（請求項1の発明）。

#### 【0013】

次に、その溶出液をステンレススチールメッシュ（150 $\mu$ m）で濾過し不溶物を除去した。次に、粗プロテオグリカンを含む溶液を遠心分離機で（4℃、10,000rpm、20分間）遠心分離した。得られた上澄み液に3倍量の食塩飽和エタノールを加えて攪拌した後、再度遠心分離機で（4℃、10,000rpm、20分間）遠心分離し、濃縮された半固形状のプロテオグリカンを得た（請求項2の発明）。

#### 【0014】

この半固形状のプロテオグリカンを再び4%酢酸に浸して溶解し、溶液を排除限界分子量100万のセルロースエステルメンブラン透析チューブで十分に透析し、純度の高い液状のプロテオグリカンを得た（請求項3の発明）。

#### 【0015】

プロテオグリカンは、凍結乾燥して、粉末状で保存することが好ましい。本実施例では透析内液を凍結乾燥して、粉末のプロテオグリカン標品240mgを得た。

#### 【0016】

請求項3の発明の方法により得られたプロテオグリカンについて、次に述べる方法により性状を調べた。

まず、化学分析の結果を表1に示す。

#### 【0017】

【表 1】

サケ鼻軟骨プロテオグリカン標品の化学分析

| モル比    |                   |                   | タンパク質 (%w/w) |
|--------|-------------------|-------------------|--------------|
| ヘキソサミン | ウロン酸              | 硫酸                |              |
| 1.00   | 0.99 <sup>a</sup> | 0.67 <sup>a</sup> | 6.99         |

<sup>a</sup> ヘキソサミンを1.00としたときのモル比で示した

## 【0018】

表1においてウロン酸及び硫酸はヘキソサミンを1.00としたときのモル比で、その値はそれぞれ0.99と0.67であり、構成成分としてのこれら三者は、ほぼ当量ずつ存在することが知られた。また、コアタンパク質は6.99% (w/w) であり、ウロン酸との比 (コアタンパク質/ウロン酸) は0.23 (w/w) であった。この比率はプロテオグリカンの純度を示すひとつの値であり、その理論値0.2に近似していた。

## 【0019】

この標品のタンパク質を構成するアミノ酸組成の分析では、試薬として販売されているウシ鼻軟骨プロテオグリカンの文献記載と同様に、グリシン、セリン、グルタミン酸が特に多く、サケ鼻軟骨プロテオグリカンの全アミノ酸1000残基中におけるグリシン、セリン、グルタミン酸三者の総計は386残基を占めている。一方、ヒドロキシプロリンについては僅か2残基であった。ヒドロキシプロリンはコラーゲンタンパク質に特徴的なアミノ酸であり、このサケ鼻軟骨プロテオグリカン標品へのコラーゲンの混入は認められるが、その量は非常に少なく、有意量とは言えない。従って、得られたサケ鼻軟骨プロテオグリカンの純度は非常に高いと言える。

## 【0020】

次にサケ鼻軟骨プロテオグリカンの分子サイズに関する情報を得るために、S B 805 H Q カラム (8×300 mm) を用いて高速液体クロマトグラフィーを行い、そのピークの溶出位置は215 nmの紫外吸収によって確認した。この際には、試薬として販売されているウシ鼻軟骨プロテオグリカンのそれと比較した

。その結果SB805HQカラムからの対称ピークとしての溶出位置 ( $K_{AV}$ ) はサケ鼻軟骨プロテオグリカンで0.28、ウシ鼻軟骨プロテオグリカンで0.17が示され、サケ鼻軟骨プロテオグリカンの分子サイズはウシ鼻軟骨プロテオグリカンのそれに比して小さいことが示された。

## 【0021】

更に、サケ鼻軟骨プロテオグリカンのコアタンパク質部分をプロナーゼ消化し、残ったGAG糖鎖部分の試料を、標準品としてのコンドロイチン6-硫酸 (Ch6S)、デルマタン硫酸 (DS) 及びヒアルロン酸 (HA) とともにセルロースアセテート膜上で電気泳動にかけた。その結果、標準品のコンドロイチン6-硫酸 (Ch6S) に一致する単一バンドが示され、サケ鼻軟骨プロテオグリカンのGAGのほとんどはコンドロイチン硫酸であることが知られた。

## 【0022】

このGAG糖鎖の二糖単位異性体についても調べた。プロテオグリカンをプロナーゼで消化した後、コントロイチナーゼABCで消化し、その際に生成する不飽和二糖を高速液体クロマトグラフィー (Polyamin-IIカラム) で分析した。その結果を表2に示す。表2より大部分は二糖一硫酸構造であった。

## 【0023】

【表2】

| 不飽和二糖分析        |                |                |                  |                  |
|----------------|----------------|----------------|------------------|------------------|
| $\Delta$ Di-OS | $\Delta$ Di-6S | $\Delta$ Di-4S | $\Delta$ Di-diSD | $\Delta$ Di-triS |
| 15.1           | 59.4           | 25.1           | 0.3              | 0.1              |

## 【0024】

以上のように、サケ鼻軟骨を原材料とするプロテオグリカンが、食品添加物としてリストに収載されている試薬 (例えば、谷村顕雄・他監修「食品中の食品添加物分析法解説書、第III部 化学的合成品以外の食品添加物」(1992年講談社発行)、あるいは食品の保存や調味料の原材料として使用される試薬 (栗飯原景昭・他監修「総合食品安全事典」(1995年産業調査会事典出版センター発行) 参照) のみで得られたことは画期的な発明である。さらに尿素による置換

、DEAE-Sepharcel法による分離精製等時間と手数の掛かる工程を不要にできたことも画期的な発明であり、より簡便でより低コストな精製方法を得るという課題を一挙に解決できたことになる。

#### 【0025】

以上の結果から、本発明に基づき得られたサケ鼻軟骨プロテオグリカンは、経口的に摂取可能で、かつ、従来の方法によるものとほぼ同等の純度であることが確認された。

#### 【0026】

##### 【発明の効果】

現在、ヒアルロン酸は、バクテリアから安全でかつ大量に得られるようになり、医薬品に応用されている。一方、プロテオグリカンは高度の水分保持能力、水分補充能力、解毒、鎮痛などの作用を持つことが知られており、さらにGAG糖鎖部分に依存した他の機能も期待されているが、これまでの精製方法により得られたプロテオグリカンでは、ヒトに用いてその有用性を調べることは不可能であった。また、サケ鼻軟骨由来の複合糖質プロテオグリカンの単離は、本出願人らが前述の特許出願による方法を用いるまでは行われたことが無く、またその利用も全くされていなかった。しかし、本発明により、優れた作用を有するプロテオグリカンを安全な方法で、かつ低コストで大量に精製することができることになったので、プロテオグリカンに対するニーズはさらに高くなり、その使用範囲も広がるものと期待される。

#### 【0027】

また、これまでサケ頭部から固形脂肪分を除去するために使用されていたクロロホルム-メタノール、アセトン等の有機溶剤も使用しないのでその廃液処理も不要となり、環境汚染の問題も生じないこととなった。そして、本発明の精製方法は、簡便でかつ効率的であり、しかもその工程によって得られたプロテオグリカンは、安全性が高く、経口的に摂取可能であり、化粧品、医薬部外品のみならず、医薬品、医療材料、加工食品、健康補助食品、人工臓器等極めて広範囲な分野で新しい応用製品の開発が可能となり、人類の健康、医学の分野において大きな貢献が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 プロテオグリカンの構造模型図

【図 2】 細胞外マトリックスの模式図

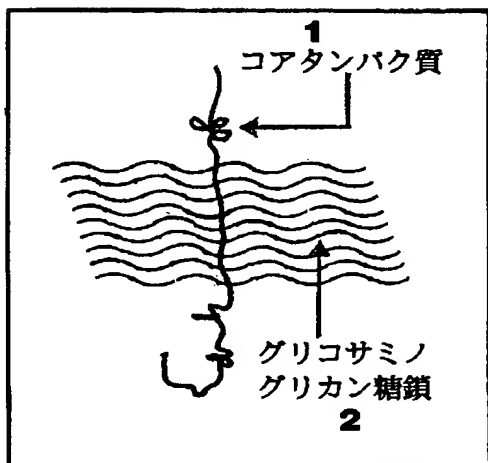
【図 3】 4 % 酢酸処理による溶出プロテオグリカンの経時的変化グラフ

【符号の説明】

- |   |          |   |               |   |           |
|---|----------|---|---------------|---|-----------|
| 1 | コアタンパク質、 | 2 | グリコサミノグリカン糖鎖、 |   |           |
| 3 | ヒアルロン酸、  | 4 | コラーゲン、        | 5 | プロテオグリカン、 |

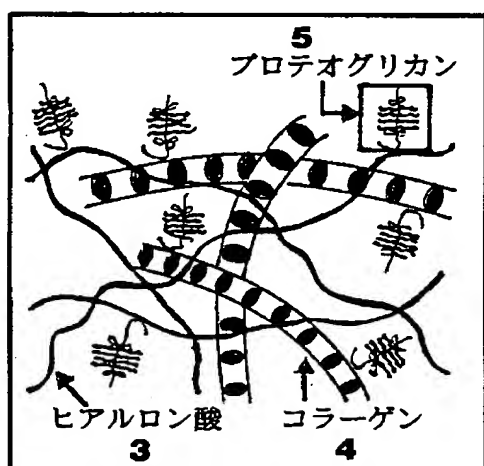
【書類名】 図面

【図 1】



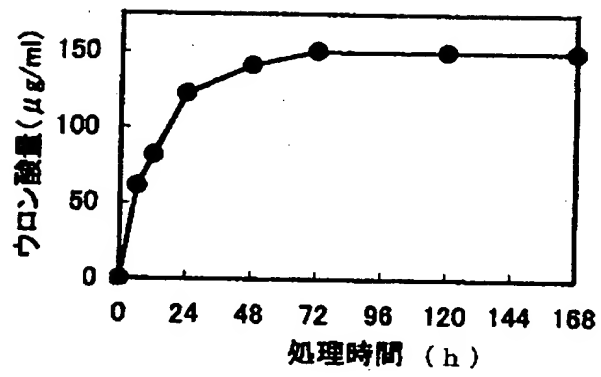
プロテオグリカンの構造

【図 2】



細胞外マトリックス

【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、有害な試薬を使用することなく簡単で低コストの軟骨型プロテオグリカンの精製方法を提供する。

【解決手段】 粗プロテオグリカンの溶出溶媒に酢酸を用いることを特徴とするプロテオグリカンの精製方法である。

【選択図】 図 3



特 2000-251071

認定・付加情報

|         |               |
|---------|---------------|
| 特許出願の番号 | 特願2000-251071 |
| 受付番号    | 50001062515   |
| 書類名     | 特許願           |
| 担当官     | 第五担当上席 0094   |
| 作成日     | 平成12年 8月25日   |

<認定情報・付加情報>

|       |             |
|-------|-------------|
| 【提出日】 | 平成12年 8月22日 |
|-------|-------------|

次頁無

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599142349]

1. 変更年月日 1999年10月 7日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 青森県青森市新町二丁目5番1号  
氏 名 株式会社角弘

出願人履歴情報

識別番号 [500394786]

1. 変更年月日 2000年 8月22日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 青森県弘前市宮園1丁目1-13  
氏 名 高垣 啓一